



## I-646 –DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA SEMI-AUTOMÁTICA DE ANÁLISE DE IMAGEM PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICROPLÁSTICO (MP-PVC) USANDO CORANTE FLUORESCENTE SELETIVO

**Ana Clara Maccarini Colombo**<sup>(1)</sup>

Graduanda em Engenharia Ambiental pela UNESP de São José dos Campos.

**Rodrigo Braga Moruzzi**<sup>(2)</sup>

Professor Associado, Instituto de Ciência e Tecnologia - ICT, Universidade Estadual Paulista - Unesp, São José dos Campos.

**Amanda Maria Dantas de Jesus**<sup>(3)</sup>

Química Licenciatura (2008) e Mestre em Ciências (2010) pela Universidade Federal de Sergipe. Doutora em Química (2014) pela Universidade Federal de São Carlos. Pós-doutoranda pela UNESP (2024).

**Rogério Galante Negri**<sup>(4)</sup>

Professor Associado, Instituto de Ciência e Tecnologia - ICT, Universidade Estadual Paulista - Unesp, São José dos Campos.

**Fabiana Alves Fiore**<sup>(5)</sup>

Engenheira Civil pela Universidade Federal de Minas Gerais (2002). Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais (2004). Doutora em Saneamento e Meio Ambiente pela Universidade de Campinas (2013). Livre-docente em Gerenciamento de Resíduos Sólidos pela UNESP (2024).

**Endereço**<sup>(1)</sup>: Estrada Dr. Altino Bondensan, 500 - Eugênio de Melo - São José dos Campos – SP – CEP: 12247-016 – Brasil – Tel: +55 (12) 3878-9500 - e-mail: [ana.maccarini@unesp.br](mailto:ana.maccarini@unesp.br)

### RESUMO

Os microplásticos (MPs) são poluentes emergentes e, atualmente, considerados onipresentes. Durante o tempo de vida das partículas plásticas “descartadas” em ambiente natural ocorrem processos físico-químicos que propiciam seu “envelhecimento”, mudando morfologia, composição e gerando quebras do material. A identificação e contagem visual/manual de MPs pode ser uma tarefa demorada devido a sua diversidade de tamanho, forma, densidade e composição. A utilização do corante seletivo Vermelho do Nilo (NR) tem sido muito empregada na identificação dos MPs, entretanto, são poucos que definem e esclarecem uma metodologia facilmente aplicável. O estudo teve por objetivo desenvolver uma metodologia identificativa otimizada e semi-automatizada para MP-PVC com utilização de NR, bem como determinar as influências do envelhecimento do MP-PVC na etapa de identificação. Para isso, foram realizados testes com dois tipos de membranas, sendo a de fibra de vidro a mais adequada para o estudo. A melhor condição de pigmentação foi a inserção do pigmento diretamente na membrana, após a filtração do MP e com aplicação de 1 mL de solução NR (10 mg/L) solubilizado em metanol. Foram propostas adaptações para a análise com o microscópio, utilizando camadas de papel celofane como filtro de luz e adicionando uma iluminação auxiliar para o direcionamento da luminosidade. As partículas de MP foram submetidas à radiação UV-C com diferentes tempos de contato, e o seu efeito foi avaliado pelo monitoramento de atributos de textura e rugosidade das imagens obtidas em MEV e por FTIR, utilizado para identificação das alterações químicas depois do processo de radiação. As adaptações realizadas no microscópio foram eficientes para obtenção das imagens e para desenvolvimento de procedimento semi-automático de análise de imagens, o que permitiu a inferência da melhor concentração, quantidade e forma de pigmentação de MPs. As imagens obtidas a partir do MEV permitiram análises numéricas, e destas, verificou-se que a entropia é uma boa métrica para averiguação de textura e irregularidade morfológica das partículas. Percebe-se que o envelhecimento de 11 dias providenciou mudanças na superfície dos MPs, e a pigmentação já não tornou-se tão efetiva. A aplicação das imagens de microscopia no *ImageJ* evidenciaram uma dificuldade identificativa dada a rugosidade da membrana de filtração, que gera: localidades de baixa luminosidade na amostra e dificuldade de foco pelo microscópio. Desta forma, a averiguação das amostras por imageamento ainda necessita de aprimoramento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microplásticos, PVC, análise semi-automática, Vermelho do Nilo.



## 1. INTRODUÇÃO

Os microplásticos (MPs) são contaminantes emergentes que geram grande preocupação global (Tadsuwan e Babel, 2021) devido a sua ocorrência generalizada no ambiente e a seus potenciais riscos aos organismos e à saúde humana (Gao, 2023). As partículas plásticas menores que 5 mm são consideradas MPs e podem ser classificadas como primárias ou secundárias. As primárias são aquelas advindas de produtos de higiene, de aplicações domésticas ou industriais, já as secundárias, são derivadas da fragmentação do material plástico originário por ações intempéricas, tanto físicas quanto químicas (Koelmans *et al.*, 2022). Atualmente, muitos estudos têm demonstrado que o envelhecimento pode alterar a estrutura da superfície e a composição química dos MPs (Liu *et al.*, 2021), por esse motivo a previsão do comportamento do MP a longo prazo no meio ambiente é um tópico relevante. No entanto, o principal desafio é a lenta degradação dos MPs em condições naturais, causada pela pouca exposição à radiação ultravioleta (UV) e efeitos biológicos e do calor (Zurier e Goddard, 2020). Como alternativa aos processos naturais, podem ser empregados métodos tecnológicos de envelhecimento em laboratório, acelerando-o através do aumento na intensidade dos fatores degradantes, como por exemplo, irradiação de luz UV-C (Liu *et al.*, 2021).

Os MPs são partículas com grande intercorrência de formatos, densidades, tamanhos e composição, além de apresentarem grande capacidade dispersiva (Mazzoni *et al.*, 2024), o que dificulta o desenvolvimento de metodologias padronizadas que sejam eficazes para identificação do poluente (Koelmans *et al.*, 2022). A quantificação de MPs pode ser realizada por procedimento de contagem manual, que normalmente é um processo complicado e demorado, ou por emprego de métodos de microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica (Woo *et al.*, 2021). Já para a identificação química, podem ser empregadas técnicas como espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), e por micro-Raman, porém, tais técnicas não oferecem resultados de forma rápida, otimizada e com baixo desprendimento de recursos (Shruti *et al.*, 2022). O desenvolvimento de procedimento automatizado de contagem pode aumentar a confiança e encurtar o tempo de resposta requerido para tomada de decisão em tempo adequado. As técnicas de análise otimizadas apresentam vantagens para uma grande diversidade de estudos na área ambiental porque podem facilitar a obtenção de resultados precisos, bem como uma padronização de averiguação para amostras.

Uma maneira promissora de identificar e analisar MPs envolve o uso do corante fluorescente seletivo Vermelho do Nilo, ou em inglês, *Nile Red* (NR). Esse corante é pouco solúvel em água, e detentor de grande capacidade de dissolução em solventes orgânicos (Greenspan, Mayer, Fowler, 1985). O uso do NR permite localizar microplásticos "ocultos" na amostra, já que uma vez aderido em superfícies hidrofóbicas, como plásticos, resulta em uma fluorescência intensa. Por outro lado, quando o NR está em estado livre, sua fluorescência é mínima (Chatterjee *et al.*, 2023). Vale ressaltar que apesar desse pigmento ter sido aplicado em uma série de estudos para identificação de MPs, existe uma grande variação relativa às metodologias de pigmentação e averiguação das amostras.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia otimizada para identificação de MP-PVC, após coloração com NR, através de técnica semi-automatizada de análise de imagens. A pesquisa também avaliou a influência nos padrões de imagem adquiridos, da exposição do MP a radiação de luz UV-C, além do estudo da concentração de corante e tipo de solvente, bem como, adaptações na aparelhagem e luminosidade na análise das imagens no microscópio.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 TESTE DE VIABILIDADE DE SOLVENTES E MEMBRANA

No presente trabalho foi avaliada a performance de 2 tipos de membrana, a de fibra de vidro com poros de 0,7 µm e a de ésteres de celulose mistos com poros de 0,45 µm. A aplicabilidade das membranas foi testada frente a diferentes solventes (etanol, metanol, acetona e hexano) adicionando algumas gotas dos solventes diretamente sobre os filtros e deixando-os em repouso por 30 minutos.

## 2.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

### SOLUÇÃO DE MPS

O MP-PVC novo utilizado na pesquisa foi adquirido em outubro de 2022 e detém tamanho aproximado de 105  $\mu\text{m}$ . O material tem aparência de um fino pó branco, e granulometria definida por peneira de -150 *mesh*. Para a preparação de sua solução, os MPs foram adicionados à água destilada em concentração arbitrária de 30 mg/L, com adição de 4 gotas de *Extran* para realização da quebra da tensão superficial do MP e garantia de seu melhor “espalhamento” na amostra.

### SOLUÇÃO DE NR

O NR foi preparado através da sua solubilização em metanol, e foram testadas duas concentrações, para que assim fosse entendido qual delas propicia a melhor pigmentação dos MPs e a melhor otimização dos recursos utilizados. Foram testadas concentrações de 0,1 mg/L e 10 mg/L de MPs em metanol.

## 2.3 TESTE DE METODOLOGIAS DE PIGMENTAÇÃO DOS MPS

Após a preparação das soluções de NR e MPs, utilizadas para realização da pigmentação das partículas plásticas, dois testes foram realizados para determinação da melhor forma de pigmentação. Para cada amostragem foram separados 100 mL de solução de MP.. A primeira metodologia testada foi descrita pela pesquisa de Mason *et al.* (2018). Nesta, identifica-se a possibilidade de pigmentar os MPs a partir da inserção de pigmento NR diretamente na solução de MP em água destilada, e posterior filtração da amostra na membrana de fibra de vidro, utilizada por Sfriso *et al.* (2020). A segunda, prevê a filtração de 100 mL da solução de MP na membrana e posteriormente, a pigmentação do MP através da disposição do NR diretamente na superfície do filtro.

Objetivando a definição de: melhor técnica de pigmentação, volume de solução de trabalho ideal e concentração de NR mais efetiva, as variáveis foram correlacionadas de diferentes formas, como mostrado na Tabela 1. Os melhores resultados de pigmentação foram escolhidos para prosseguimento do estudo. O branco do procedimento foi realizado utilizando-se a solução de MP na mesma concentração e volume dos demais testes, porém sem a etapa de pigmentação.

**Tabela 1: Condições estudadas para membrana de fibra de vidro**

Teste	Concentração de NR em metanol		Volume de solução de trabalho de NR inserida		Método de inserção do NR	
	0,1 mg/L	10 mg/L	1 mL	1 mL	Na solução de MP (pré filtração)	No filtro (após filtração)
1	X		X		X	
2	X			X	X	
3		X	X		X	
4		X		X	X	
5	X			X		X
6		X		X		X



As soluções de NR foram condicionadas em um vidro de coloração âmbar, e estocadas em uma geladeira a 9°C, para que desta forma fosse possível desacelerar o processo de degradação da solução preparada, como também proposto por Shim *et al.* (2016).

## 2.4 ESTUDO DAS VARIÁVEIS ÓPTICAS - MICROSCOPIA

Para análise qualitativa da coloração das amostras foi utilizado um estereomicroscópio com foco motorizado M205 C, da marca Leica, com algumas adaptações, como sugerido por Labbe *et al.*, (2020), para isso foram utilizadas folhas de papel celofane como filtro de luz, além disso, foi adicionada uma iluminação auxiliar através de um canhão de luz acoplado, para facilitar o direcionamento da luminosidade.

A partir das imagens dos MPs no microscópio, foram verificadas as variáveis que implicam na aquisição de imagens, a saber: intensidade de cada tipo de filtro, coloração do filtro acoplado à objetiva, temperatura da luz auxiliar, presença de filtro amarelo na luz auxiliar, porcentagem de brilho da luz principal, uso ou não de laser e as variáveis do *software* (ganho e exposição).

## 2.5 PROCESSO DE ENVELHECIMENTO POR RADIAÇÃO UV-C E IDENTIFICAÇÃO POR MEV E FTIR

As partículas de MP (30 g) foram submetidas a radiação UV-C por meio da exposição a 6 lâmpadas Philips TUV de 15W/cada, montadas em caixa de alumínio onde permaneciam por diferentes tempos de contato, visando simular o envelhecimento natural, conforme descrito por Lin *et al.* (2020). Foi utilizado um reator de UV-C, conforme Figura 1. As amostras foram submetidas ao envelhecimento no intervalo de 4, 6 e 11 dias. A Tabela 2 mostra a identificação das amostras, bem como a quantidade de dias que foram submetidas a envelhecimento mecânico acelerado.



Figura 1: Câmara de envelhecimento a partir de UV-C

Tabela 2: Identificação e dias de envelhecimento das amostras de MP

Identificação das amostras	Dias de envelhecimento
0	Sem envelhecimento
1	4
2	6
3	11

O efeito do UV-C sobre as partículas foi avaliado pelo monitoramento de atributos de textura e rugosidade das imagens obtidas em MEV utilizando um microscópio eletrônico de varredura modelo – MEV Quanta 250 (FEI), com magnificação de 2.000, 5.000 e 20.000 vezes. Antes das análises, todas as amostras de MPs passaram pelo processo de metalização com ouro, a fim de melhorar a condutividade da amostra.

Todas as imagens foram posteriormente analisadas conforme suas características por processos de imageamento. Foram definidas 8 bandas de caracterização, sendo elas: média, variância, homogeneidade, contraste, dissimilaridade, entropia, segundo momento e correlação. Para cada uma das bandas foram definidos valores de níveis de cinza, e para tal, a quantidade de pixels relacionados foram quantificados também.

Para análise desses dados, foram realizados histogramas para as bandas das imagens, relativos a cada magnificação. Apesar da possibilidade de averiguação de diferentes parâmetros para análise de imagens, percebe-se que a entropia é promissora, como apresentado por Espinosa *et al.*, (2021), já que esta métrica avalia a variação de textura e irregularidade. Conforme os mesmos, a criação de um histograma normalizado representa uma função de intensidade que demonstra a contagem de pixels em relação a posição. A formulação que demonstra a correlação é apresentada na Equação 1.

$$\text{Entropia} = \sum p_i \log_2 p_i \quad \text{Equação (1)}$$

Os valores de  $p_i$  são adquiridos através de uma matriz de co-ocorrência, definida pela Equação 2 (Espinosa *et al.* 2021), que infere sobre uma matriz  $n \times m$ .

$$C_{\Delta x, \Delta y}(i, j) = \sum_{x=1}^n \sum_{y=1}^m \{1, \text{ se } I(x, y) = i \text{ e } I(x + \Delta x, y + \Delta y) = j; 0, \text{ caso contrário}\}$$

Equação (2)

Na Equação 2, os valores de  $i$  e  $j$  referem-se ao valor do pixel, enquanto  $x$  e  $y$  a posição espacial dos mesmos. As variáveis  $\Delta x$  e  $\Delta y$  são relativas à relação espacial a qual a matriz é calculada. Por fim,  $I(x, y)$  informa o valor do pixel em determinada localidade da imagem.

Para análise química do efeito da ação da radiação UV-C foi empregada a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando um Espectrofotômetro modelo Prestige 21 (Shimadzu).

A análise de pigmentação das amostras envelhecidas também será realizada, visto que no meio natural os MPs encontram-se em diferentes estágios de degradação, e a metodologia aplicada de identificação de MPs deve ser efetiva para o material em todo o seu tempo de permanência na natureza. Desta maneira, pretende-se entender a influência dessa variável na capacidade de pigmentação do MP a partir de uma situação controlada de bancada. Conforme Liu *et al.* (2021), a submissão dos plásticos a fatores de envelhecimento acelerado durante alguns dias ou meses, equivalem ao envelhecimento atingido em dezenas ou centenas de anos de forma natural.

## 2.6 SEMI-AUTOMATIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO

A semi-automatização do procedimento foi realizada através da aplicação das imagens no *software* de análise de imagens *ImageJ* após sua pigmentação e visualização no microscópio. A partir deste procedimento pretende-se definir a metodologia de identificação dos MPs dentro do aplicativo, para que assim, seja possível automatizar o método. Nesta etapa, as imagens devem ser adicionadas ao *software*, e, inicialmente, a identificação das partículas de MPs será realizada dada a coloração das mesmas, já que o pigmento NR proporciona-os coloração roxa. Inicialmente, as imagens precisam ser convertidas para imagens de 8-bits, para que assim, seja composta apenas por níveis de cinza. Posteriormente, por limite de coloração, ou “*threshold*”, a imagem será dividida em pontos de coloração branca ou preta. Sendo a cor branca definida como a cor dos MPs nas imagens já tratadas.

## 3. RESULTADOS - ANÁLISE E DISCUSSÃO

### 3.1 PERFORMANCE DAS MEMBRANAS

A primeira etapa do teste de performance das membranas foi relativa ao comportamento desses filtros com o solvente orgânico utilizado no preparo da solução do corante. A Tabela 3 mostra a membrana de fibra de vidro após a reação de 30 min com diferentes solventes.

Tabela 3: Teste de membrana de fibra de vidro

Etanol	Metanol	Acetona	Hexano
			

Por meio desse teste foi possível observar que a membrana de fibra de vidro não apresentou nenhum tipo de rompimento ou mudança física quando interagiu com os 4 solventes estudados. O que corrobora com os resultados de Prata *et al.* (2021), no qual sugere que esse tipo de membrana poderia ser utilizada como filtro para retenção dos MPs. O mesmo teste foi realizado para a membrana de ésteres de celulose mistos e são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Teste de membrana ésteres de celulose mistos

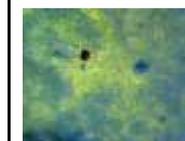
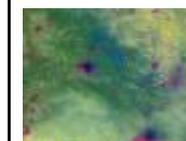
Etanol	Metanol	Acetona	Hexano
			

A performance da membrana ésteres de celulose mistos foi menos eficiente que a de fibra de vidro, provavelmente devido a seus componentes químicos mais sensíveis aos solventes. Apesar dos solventes não terem produzido mudança de coloração na membrana de ésteres, assim que os solventes: etanol, acetona e hexano foram adicionados nas membranas, o material filtrante dobrou-se, e assim, passou a apresentar riscos de perda das amostras. Desta forma, a possibilidade de uso dos solventes supracitados para essa membrana foi descartada. Considerando a compatibilidade da membrana de fibra de vidro com todos os solventes, o metanol foi o solvente orgânico escolhido para os demais procedimentos.

### 3.2 METODOLOGIAS DE PIGMENTAÇÃO DOS MPS

Após a filtração, pigmentação e secagem das diferentes amostras, as imagens de microscopia foram adquiridas. Quanto maior o tempo decorrido desde a preparação das amostras até sua análise, ocorrem perdas de luminescência do MP, sugerindo degradação da amostra. Assim, a metodologia de preparação do pigmento e análise das amostras foi realizada em período menor que 24 horas. A resposta do procedimento metodológico de microscopia, realizado logo após a aquisição das amostras, é verificada na Tabela 5.

**Tabela 5: Imagens de microscopia em filtro de fibra de vidro a título de exemplo.**

Amostra	1	2	3	4	5	6
Sem ampliação						
Ampliação de 160x						

No decorrer do procedimento identificativo, evidenciou-se que as variáveis ópticas promoviam diferentes resultados. As membranas 1, 2 e 5, de concentração de pigmento de 0,1 mg/L, apresentaram os menores graus de pigmentação. Nas imagens de microscopia das amostras 1, 2 e 5, sem ampliação, não podem ser verificadas partículas pigmentadas. As membranas com tingimento mais relevante são: 3, 4 e 6, todas com concentração de NR de 10 mg/L, evidenciando que essa concentração foi a que produziu os resultados mais satisfatórios relativos ao objetivo da pesquisa.

Dentre as amostras com concentração de 10 mg/L, a pigmentação da membrana 3 foi a menos evidente, apesar de, nas imagens sem ampliação, ser possível identificar aglomerados de MPs. Quando aplicada a ampliação de 160x, não se torna possível distinguir os MPs com facilidade devido à baixa luminescência dos mesmos, podendo ainda serem confundidos com as rugosidades da membrana. As duas pigmentações mais promissoras são as das amostras 4 e 6, permitindo concluir que o volume mais indicado para melhores visualizações é de 1 mL. A maior luminescência também é percebida nas membranas submetidas a aplicação de NR diretamente em sua superfície.

### 3.3 ESTUDO DAS VARIÁVEIS ÓPTICAS - MICROSCOPIA

A realização de diferentes combinações entre as variáveis ópticas, evidenciou que algumas propiciavam melhores resultados na aquisição das imagens que outras. O filtro verde apresentou melhor resposta quando acoplado na objetiva, enquanto a camada de filtro amarelo, deveria ser alocada juntamente com a luz auxiliar. Além disso, o aumento na quantidade de camadas do papel celofane apenas gerava o escurecimento das imagens, e não significava melhor visualização das partículas plásticas. Desta maneira utilizou-se apenas uma camada de filtro amarelo e verde.

Para a luz auxiliar foi observado que a de coloração branca apresentou melhor resposta que o laser verde, pois esse último gerava a degradação acelerada da amostra, averiguada por sua perda de coloração. Dentre as variáveis inerentes ao *software*, estabeleceu-se ganho de 45. A obtenção das imagens com variação das variáveis ópticas, permitiu definir que a melhor combinação referiu-se ao teste no qual o brilho da iluminação principal estava em 0%, e coloração de iluminação auxiliar de 3050k. As configurações de *software* utilizadas são relacionadas à exposição de 101 ms. A imagem obtida a partir das métricas e variáveis definidas como padrão é apresentada na Figura 2. Nessa imagem de microscopia foi possível observar que além de minúsculas partículas de MP pigmentadas, aglomerados maiores também reagiram totalmente com o corante NR.



Figura 2: Microscopia do melhor resultado (Teste 11)

### 3.4 PROCESSO DE ENVELHECIMENTO POR RADIAÇÃO UV-C E IDENTIFICAÇÃO POR MEV E FTIR

As amostras envelhecidas foram averiguadas através da microscopia aplicando as melhores condições de pigmentação e variáveis ópticas determinadas neste trabalho. As imagens com ampliação de 25 e 160 vezes, bem como a identificação sem microscopia, são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados de microscopia de amostras envelhecidas

Identificação da amostra	Dias de envelhecimento	Averiguação visual	Ampliação de 25x	Ampliação de 160x
0	sem envelhecimento			
1	4			

Continua

2	6			<i>Continuação</i> 
3	11			

A amostra de número 0, com 25 vezes de ampliação e sem nenhum tipo de envelhecimento, apresentava muitas partículas visíveis, com coloração roxa e bastante aglomerado de MP. Com a ampliação de 160 vezes, as micropartículas detinham coloração roxa intensa.

Com o início do processo de envelhecimento, observou-se uma diminuição da quantidade de partículas visíveis, mesmo através da microscopia. Na imagem com ampliação de 25 vezes da amostra 2, percebe-se uma grande partícula de MPs aglomerados, entretanto, no restante da superfície da membrana, é observada uma grande escassez dos polímeros. As imagens com 160 vezes de aproximação permitem identificar que quanto mais envelhecida a amostra, menor a sua intensidade de pigmentação, de forma que na amostra de número 3 a visualização do microplástico é muito dificultada e pouco expressiva.

É sabido que o envelhecimento das partículas por intermédio de radiação UV-C propicia a quebra do MP em partículas ainda menores (Lin *et al.*, 2020). Com isso, a fim de identificar se o período de envelhecimento decorrido já proporcionava tais mudanças morfológicas, realizaram-se 6 medições do diâmetro de partículas aleatórias verificadas nas imagens de aproximação de 160 vezes. As medidas foram realizadas diretamente no *software* do Estereomicroscópio com foco motorizado M205 C e os resultados das medições podem ser visualizados na Tabela 7.

**Tabela 7: Medidas de diâmetro dos MPs**

	Medida ( $\mu m$ )						Média das medidas ( $\mu m$ )
	1	2	3	4	5	6	
<b>Amostra 0</b>	32,91	14,54	13,39	15,00	24,86	17,09	19,6
<b>Amostra 1</b>	21,06	12,6	14,78	17,67	17,00	10,32	15,6
<b>Amostra 2</b>	19,17	19,11	5,89	16,68	9,60	11,36	13,6
<b>Amostra 3</b>	8,11	22,2	7,58	9,74	24,12	4,87	12,8

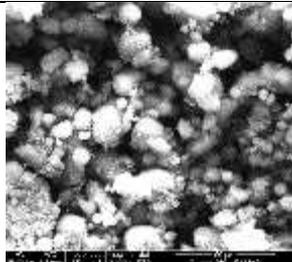
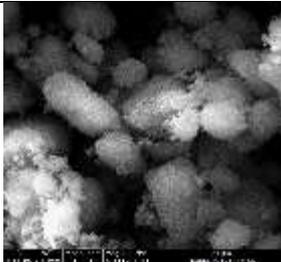
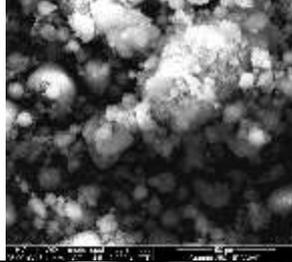
A partir da análise dos valores médios dos diâmetros das partículas plásticas foi possível identificar que quanto maior o tempo de envelhecimento, menor é a média. Assim, por mais que algumas medidas de diâmetro da amostra 3 ainda sejam equiparáveis àquelas visualizadas na amostra sem envelhecimento, na média, as partículas são menores. Sabe-se que o tempo de envelhecimento das partículas ainda não são representativos das características de MPs que podem ser encontradas em amostras ambientais. Desta forma, quanto mais envelhecidas são as amostras, mais acentuadas serão as quebras e diminuições de intensidade de luminescência.

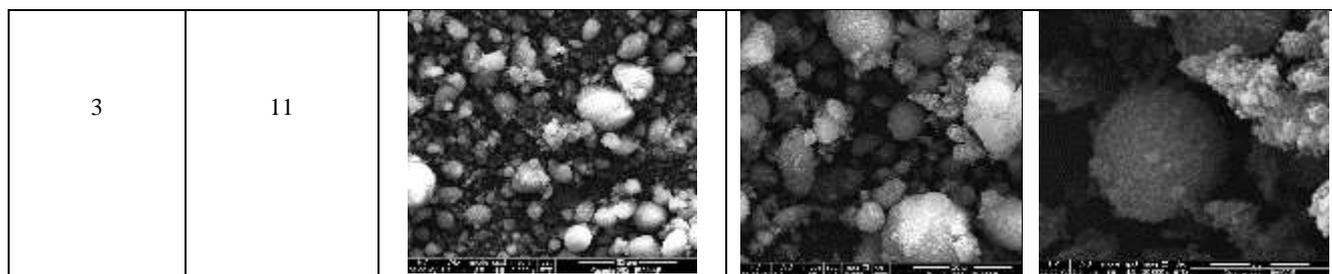
Outra característica importante a ser discutida é a averiguação visual da coloração das amostras sem a utilização de microscopia, conforme apresentado na Tabela 06. Identificou-se que, quanto mais envelhecidas as amostras, mais fortes eram as colorações roxas verificadas nas “bordas” dos microplásticos, diretamente em contato com a membrana, podendo indicar o aumento da superfície de contato e deposição do pigmento em tais localidades dada a mudança na rugosidade das partículas plásticas devido à radiação UV-C, como também relatado por Luo *et al.* (2022).

### 3.5 ANÁLISE POR MEV

Verificada a importância do entendimento do envelhecimento na superfície dos microplásticos, as partículas de MP foram analisadas no MEV. As imagens adquiridas no processo são apresentadas na Tabela 8, divididas conforme sua magnificação, sendo elas 2.000, 5.000 e 20.000 vezes.

**Tabela 8: Efeito do envelhecimento em diferentes tempos de contato em análises de MEV**

Identificação da amostra	Dias de envelhecimento	Ampliação 2.000x	Ampliação 5.000x	Ampliação 20.000x
0	sem envelhecimento			
1	4			
2	6			



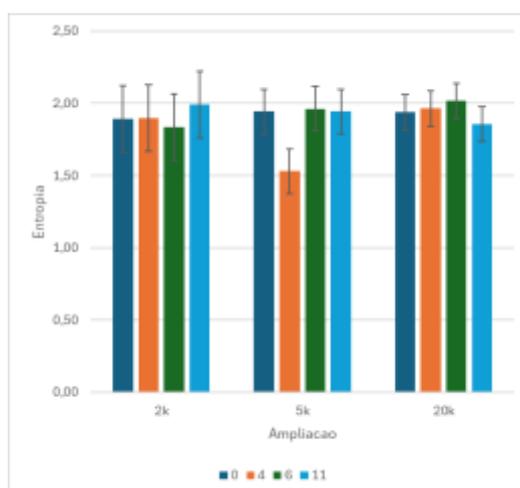
As imagens averiguadas na Tabela 8 permitem inferir que visualmente, as mudanças morfológicas não se apresentam de maneira tão expressiva. O que pode-se inferir, analisando as imagens com magnificação de 2.000 vezes, é que as partículas plásticas com 11 dias de envelhecimento aparentam ter diminuído de tamanho quando comparadas às partículas de MP com 4 e 0 dias de envelhecimento. Verificada a dificuldade de avaliação dos MPs de forma visual, as imagens foram submetidas a métodos numéricos analíticos.

Através das análises numéricas, identificou-se que a entropia é uma variável importante para o entendimento do envelhecimento sob as partículas poliméricas. Tornou-se imprescindível identificar se a magnificação seria um fator de influência nos resultados das análises numéricas, e por isso, os valores de entropia, para cada um dos tempos de envelhecimento, correlacionados às suas respectivas magnificações, foram tabelados e apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9: Verificação da influência da magnificação no parâmetro entropia**

Entropia	2k	5k	20k
0	1,89	1,94	1,94
4	1,90	1,53	1,96
6	1,84	1,96	2,01
11	1,99	1,94	1,85

Os valores da tabela 9, são apresentados, graficamente, na Figura 3.

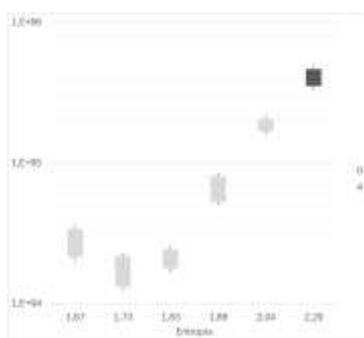


**Figura 3: Verificação da influência da magnificação no parâmetro entropia**

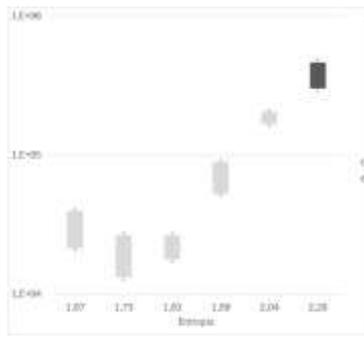


A partir da Figura 3, torna-se possível inferir que os níveis de magnificação não influenciam tão significativamente na entropia de cada um dos tempos de envelhecimento, podendo assim, analisar-se apenas uma magnificação, que seja então representativa das demais. Desta forma, foi escolhida a magnificação de 2.000 vezes para que a entropia fosse analisada com mais detalhamento.

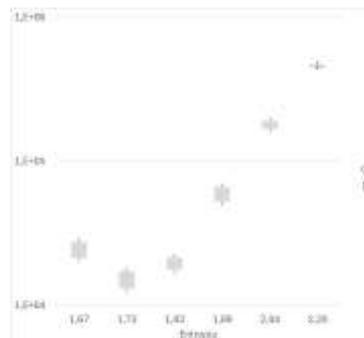
Para esta magnificação, foram verificadas as entropias relacionadas a cada faixa de nível de cinza, para cada um dos períodos de envelhecimento, sendo eles: 4, 6 e 11 dias. As Figuras 4, 5 e 6 são apresentadas a seguir, e referem-se respectivamente ao envelhecimento de 4, 6 e 11 dias.



**Figura 4: Entropia  
4 dias de envelhecimento**



**Figura 5: Entropia  
6 dias de envelhecimento**

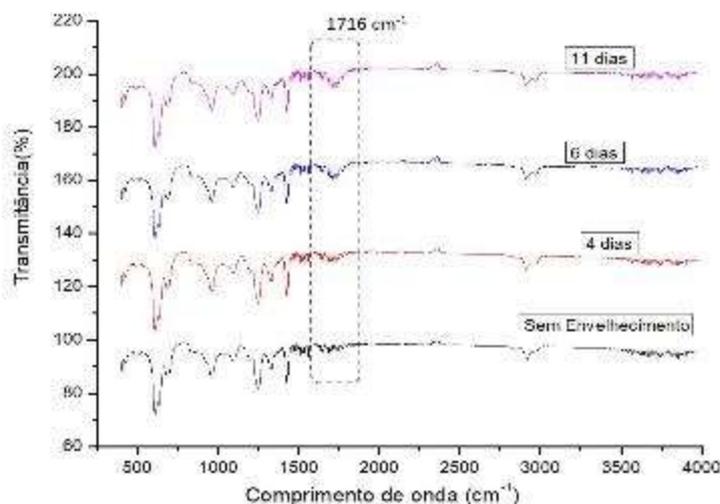


**Figura 6: Entropia  
11 dias de envelhecimento**

As Figuras 4 a 6 apresentadas permitem verificar que em algumas condições, a medida de entropia é sensível às alterações de textura afetadas pelo envelhecimento. Para valores de entropia maiores que 2, existem maiores diferenças em relação ao tempo de envelhecimento estudados. A distribuição de *pixel* concentra-se nas maiores classes de entropia, sendo mais marcado para os intervalos de 4 e 6 dias. Embora preliminares para essa aplicação, verifica-se potencial para uso dessa ferramenta para análise de envelhecimento de MP, sendo necessária mais pesquisa no futuro para confirmar a tendência observada.

### 3.6 ANÁLISE POR FTIR

A análise por FTIR possibilitou a identificação química das amostras de MP que passaram por diferentes intervalos de envelhecimento. Os difratogramas dessas amostras são apresentados na Figura 7.



**Figura 7: Difratogramas de MP-PVC envelhecido em diferentes tempos de exposição.**

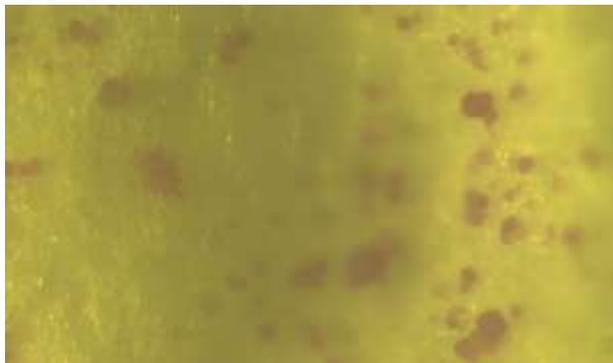
Os difratogramas das amostras de MP-PVC que passaram pelo processo de envelhecimento pela radiação UV-C mostram que a oxidação do material acontece já com 6 dias de irradiação e vai gradualmente aumentando. Isso é comprovado pelo aparecimento do pico de carbonila em  $1716\text{ cm}^{-1}$ . Lin *et al.* (2020) também verificaram mudanças nas características químicas do PVC depois da exposição de radiação UV. Os autores observaram novos picos de absorção que apareceram em  $1720\text{ cm}^{-1}$  e foram identificados vibração de alongamento de grupos carbonila ( $\text{C} = \text{O}$ ). Estes novos picos sugeriram a geração de estruturas carbonílicas durante a irradiação por UV.

### 3.7 ANÁLISE IMAGEJ

Todas as imagens tratadas através do *software ImageJ* foram analisadas conforme as mesmas condições de tratamento de imagem. Inicialmente, evidenciou-se que as imagens de ampliação de 25 vezes não apresentavam resultados válidos para identificação dos MPs, dado seu tamanho diminuto. Esta característica gera ruídos na identificação com utilização do *software* nas localidades referentes às rugosidades do filtro, que são confundidas com as colorações de MPs. Mesmo após tratadas, as imagens com 25 vezes de aumento, não propiciavam a visualização dos MPs. Dada a ineficiência da averiguação das partículas para aproximação de 25 vezes, estas foram descartadas das análises pelo *software*.

O primeiro teste de identificação por *software* foi aferido para os MPs sem envelhecimento, dado que visualmente, com auxílio de microscopia, estes foram os que obtiveram pigmentações mais efetivas. Desta forma, entende-se que estes seriam os que possivelmente forneceriam os melhores resultados a partir do imageamento.

As imagens original e tratada da amostra de número 0, do MP-PVC novo, com ampliação de 160 vezes são apresentadas respectivamente pelas Figuras 8 e 9.



**Figuras 8 e 9: Imagens original e tratada, respectivamente - ampliação: 160x**

As imagens foram adquiridas conforme os ajustes automáticos do *software*, e assim, apresentaram muito ruído, referente à rugosidade do material da membrana, que também prejudica a precisão do foco do microscópio. Desta forma, apesar de a identificação visual por coloração ter sido efetiva, é perceptível que o tratamento de imagens ainda necessita ser refinado, para que as características do material da membrana e do foco do microscópio não afetem a identificação semi-automatizada das amostras, causando subestimação ou superestimação dos resultados obtidos.



#### 4. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível verificar que a membrana de fibra de vidro se apresenta mais apropriada em comparação a membrana de ésteres de celulose mistos para estudo com MP e corante seletivo NR. Os testes realizados na membrana de fibra de vidro, permitiram identificar que as melhores condições de pigmentação foram com a inserção de 1 mL da solução de NR (10 mgNR/L) diretamente na membrana, após a filtração dos MPs. Através dos resultados de MEV e FTIR foi possível observar que a radiação de 6 lâmpadas Philips TUV 15W UV-C por 6 dias já apresentou degradação do MP-PVC.

As imagens adquiridas pelo MEV, submetidas a procedimento analítico, permitiram inferir que 11 dias de envelhecimento por radiação UV-C resultaram em mudanças morfológicas nas partículas de MP-PVC, conforme verificado pela análise da medida de Entropia. A constatação do nível de oxidação do material plástico foi realizada a partir do FTIR, e este indica um envelhecimento mais efetivo a partir do 6 dia de envelhecimento. Em relação a semi-automatização do procedimento, a utilização do *software ImageJ* ainda precisa ser aprimorada, visto a presença de ruídos.

O desenvolvimento de técnicas mais eficientes de monitoramento de MP-PCV poderá permitir maior precisão na quantificação desses contaminantes em água. Trabalhos futuros ainda devem ser desenvolvidos para aprimoramento da metodologia.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao fomento do CNPq, e a PIBIC (projeto nº 10259), que tornaram possível o estudo, juntamente com os esforços dos Professores Dr. Rodrigo Braga Moruzzi, Dr. Rogério Galante Negri, Dra Fabiana Alves Fiore e a Dra Amanda Maria Dantas de Jesus; Ao Instituto de Estudos Avançados do Mar - IEAmar (Prof<sup>a</sup> Dra Gabriela Hurtado e Eduardo do Valle Ricardo) e ao Laboratório de Saneamento do ICT/UNESP de SJ. Rodrigo Moruzzi agradece a FAPESP 2023/08052-1 e ao CNPq-PQ 309788/2021-8.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, F. et al. **Estudo da degradação de embalagens plásticas oxidegradáveis expostas ao envelhecimento acelerado.** In: 10th Congresso Brasileiro de Polímeros. 2009.
2. BRACHO, Nicolino et al. Identificación de polietileno y su degradación foto-oxidativa entre los microplásticos muestreados en el frente costero del Lago de Maracaibo. In: **Congreso Venezolano de Catálisis.** 2021.
3. BUFAROOSHA, Muna et al. **The Effect of UV Aging on the Structure of PVC in the Presence of Organotin (IV) Compounds.** Al-Nahrain Journal of Science, v. 23, n. 1, p. 57-61, 2020.
4. CHATTERJEE S., KROLIS E., MOLENAAR R., CLAESSENS M. M.A.E., BLUM C., Nile Red staining for nanoplastic quantification: Overcoming the challenge of false positive counts due to fluorescent aggregates, *environmental Challenges*, Volume 13, 2023, 100744, ISSN 2667-0100
5. DE OLIVEIRA, Bruno Leonardo Marques Castro. Quantificação e distribuição vertical de microplásticos na coluna d'água em represa urbana. 2020.
6. EERKES-MEDRANO, Dafne; THOMPSON, Richard C.; ALDRIDGE, David C. Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritization of research needs. **Water research**, v. 75, p. 63-82, 2015.
7. ESPINOSA, Ricardo; BAILÓN, Raquel; LAGUNA, Pablo. Two-dimensional EspEn: A new approach to analyze image texture by irregularity. **Entropy**, v. 23, n. 10, p. 1261, 2021.
8. ESTAHBANATI, Shirin; FAHRENFELD, Nicole L. Influence of wastewater treatment plant discharges on microplastic concentrations in surface water. **Chemosphere**, v. 162, p. 277-284, 2016.
9. GAO Z., CIZDZIEL J. V., CHEN L., Microplastics profile in sludge from a university wastewater treatment plant and the influence of chemical digestions on Nile red stained microplastics, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 11, Issue 3, 2023, 109671, ISSN 2213-3437.
10. GREENSPAN, Phillip; MAYER, Eugene P.; FOWLER, Stanley D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **The Journal of cell biology**, v. 100, n. 3, p. 965-973, 1985.



11. KOELMANS, Albert A. et al. **Risk assessment of microplastic particles.** Nature
12. LABBE, Amelia B.; BAGSHAW, Clive R.; UTTAL, Lisa. Inexpensive adaptations of basic microscopes for the identification of microplastic contamination using polarization and Nile Red fluorescence detection. **Journal of Chemical Education**, v. 97, n. 11, p. 4026-4032, 2020.
13. LIN, Jialing et al. Ultraviolet-C and vacuum ultraviolet inducing surface degradation of microplastics. **Water Research**, v. 186, p. 116360, 2020.
14. LIU, Peng et al. Review of the artificially-accelerated aging technology and ecological risk of microplastics. **Science of the total environment**, v. 768, p. 144969, 2021.
15. LUO, Hongwei et al. Effects of aging on environmental behavior of plastic additives: Migration, leaching, and ecotoxicity. **Science of The Total Environment**, v. 849, p. 157951, 2022.
16. MAES, Thomas et al. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 44501, 2017.
17. MAZZONI, Talita Sarah et al. A invisibilidade dos microplásticos-uma macroameaça ao meio ambiente e à saúde humana. **Saneamento, Saúde e Ambiente Volume 2**, p. 82.
18. NEL, Holly A. et al. Detection limits are central to improve reporting standards when using Nile red for microplastic quantification. **Chemosphere**, v. 263, p. 127953, 2021.
19. PRATA, Joana C. et al. A new approach for routine quantification of microplastics using Nile Red and automated software (MP-VAT). *Science of the total environment*, v. 690, p. 1277-1283, 2019.
20. PRATA, Joana C. et al. Microplastics and fibers from three areas under different anthropogenic pressures in Douro river. *Science of the total environment*, v. 776, p. 145999, 2021.
21. RAMESH, S. et al. FTIR studies of PVC/PMMA blend based polymer electrolytes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 4-5, p. 1237-1242, 2007.
22. SARRIA-VILLA, Rodrigo Andrés; GALLO-CORREDOR, José Antonio. La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos. **Journal de Ciencia e Ingeniería**, v. 8, n. 1, p. 21-27, 2016.
23. SFRISO, Andrea Augusto et al. Microplastic accumulation in benthic invertebrates in Terra Nova bay (Ross Sea, Antarctica). **Environment international**, v. 137, p. 105587, 2020.
24. SHIM, Won Joon et al. Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. **Marine pollution bulletin**, v. 113, n. 1-2, p. 469-476, 2016.
25. SHRUTI, V. C. et al. Analyzing microplastics with Nile Red: Emerging trends, challenges, and prospects. **Journal of hazardous materials**, v. 423, p. 127171, 2022.
26. TADSUWAN K, BABEL S. Microplastic contamination in a conventional wastewater treatment plant in Thailand. *Waste Management & Research*. 2021;39(5):754-761.
27. VIDAL, Cristiane. **Identificação de microplásticos no ambiente e detecção de impurezas em café por imageamento hiperespectral na região do infravermelho próximo (HSI-NIR) e quimiometria.** 2022. Tese de Doutorado.
28. WOO, H.; SEO, K.; CHOI, Y.; KIM, J.; TANAKA, M.; LEE, K.; CHOI, J. Methods of Analyzing Microsized Plastics in the Environment. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 10640.
29. ZIAJAHROMI et al. Wastewater treatment plants as a pathway for microplastics: Development of a new approach to sample wastewater-based microplastics. **Water Research**, v. 112, p. 93-99, 2017.
30. ZURIER H.S. , Goddard J.M. Biodegradation of microplastics in food and agriculture *Curr. Opin. Food Sci.*, 37 (2020), pp. 37-44